FICHE TECHNIQUE

RHAPSODY AGAR®

DENOMBREMENT DE *PSEUDOMONAS* SPP.

1 DOMAINE D'UTILISATION

RHAPSODY Agar® est un milieu sélectif destiné au dénombrement de *Pseudomonas* spp. dans les produits alimentaires et les échantillons de l'environnement.

La méthode est certifiée NF VALIDATION pour le dénombrement de *Pseudomonas spp* présomptifs dans les produits carnés, par comparaison à la méthode de référence NF EN ISO 13720 : 2010, sous Attestation N° BKR 23/09-05/15 A, dont le terme de validité est fixé au 5 juin 2019.

BKR 23/09/-05/15 A,
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE
POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification **http://nf-validation.afnor.org**

La méthode est certifiée NF VALIDATION pour le dénombrement de *Pseudomonas spp* dans les produits laitiers, par comparaison à la méthode de référence XP ISO/TS 11059 :2009, sous Attestation N° BKR 23/09-05/15 B, dont le terme de validité est fixé au 5 juin 2019.

BKR 23/09/-05/15 B,
METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE
POUR L'AGROALIMENTAIRE
Certifié par AFNOR Certification **http://nf-validation.afnor.org**

La méthode validée selon le protocole NF EN ISO 16140 permet d'obtenir un dénombrement en 48 ± 3 heures d'incubation et ne nécessite pas de confirmations, ni pour les produits laitiers, ni pour les produits carnés.

2 PRINCIPES

Les peptones constituent les substrats nutritifs nécessaires à la multiplication rapide des *Pseudomonas*.

Le substrat chromogénique inclus dans le milieu de culture est hydrolysé par tous les *Pseudomonas*. Les colonies présentent alors une coloration bleue pâle à bleu-vert.

Le système sélectif retenu et la céphalosporine permettent l'inhibition de la majorité de la flore annexe.

3 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée/supplémentée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1010 mL de milieu complet:

- Polypeptone ..... 28,9 g
- Système tampon ..... 7,0 g
- Chlorure de sodium ..... 5,0 g
- Système sélectif ..... 5,5 g
- Système chromogène ..... 0,2 g
- Agar agar bactériologique ..... 15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

4 PREPARATION

Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 61,6 g de milieu déshydraté (BK214) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacons de 100 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 110 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C.

✓ **Reconstitution : 61,6 g/L**

✓ **Stérilisation : 15 min à 110 °C**

Réhydratation du supplément lyophilisé :

- Reprendre le lyophilisat (BS089) en y ajoutant aseptiquement 5 mL d'eau distillée stérile.
- Agiter le flacon plusieurs fois de façon à assurer une complète dissolution, tout en évitant la formation de mousse.

Préparation du milieu complet :

- Ajouter 1 mL de supplément sélectif RHAPSODY® (BS08908) reconstitué dans chaque flacon de 100 mL de milieu de base.
- Homogénéiser parfaitement.
- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.

5 MODE D'EMPLOI

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (se référer à la norme NF EN ISO 7218).

- A la surface du milieu préparé en boîtes ou du milieu pré-coulé (BM167), transférer 0,1 mL de l'échantillon à analyser et de ses dilutions décimales.
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à 30 ± 1 °C pendant 48 heures ± 3 heures.

✓ **Ensemencement : En surface**

✓ **Incubation : 48 ± 3 h à 30 ± 1 °C**

Notes

- La méthode est validée également avec la technologie d'ensemencement Spiral.
- La limite de dénombrement peut être diminuée d'un facteur de 10 en ensemençant 1,0 ml de l'échantillon ou de la suspension mère sur la surface de trois petites boîtes de gélose (90 mm).

Pour des raisons d'organisation des laboratoires, la durée d'incubation est validée entre 45 et 72 heures.

6 LECTURE

Les colonies caractéristiques présentent une coloration bleue pâle à bleu vert.
La taille des colonies et l'intensité de la coloration peuvent varier selon les espèces de *Pseudomonas* rencontrées.
L'expression des résultats se fera conformément aux recommandations établies dans la norme NF EN ISO 7218.

Note
Si l'interprétation est sujette à doute après 48 heures (colonies trop pâles), l'incubation doit être prolongée jusque 72 heures.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

7 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre beige, fluide et homogène.
Milieu complet : gélose ambrée.

Réponse culturale typique sur milieu complet après 48 heures d'incubation à 30 °C :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)
Pseudomonas aeruginosa	WDCM 00026	$P_R \geq 50\%$
Pseudomonas aeruginosa	WDCM 00025	$P_R \geq 50\%$
Pseudomonas putida	WDCM 00117	$P_R \geq 50\%$
Pseudomonas fluorescens	WDCM 00115	$P_R \geq 50\%$
Escherichia coli	WDCM 00013	Inhibée, score 0
Staphylococcus aureus	WDCM 00034	Inhibée, score 0

8 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.
Supplément lyophilisé : 2-8 °C.
Milieu pré-coulé : 2-8 °C, à l'abri de la lumière.
Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu préparé en boîtes (*) : 30 jours à 2-8°C, à l'abri de la lumière.
(*) : Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

9 PRESENTATION

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (∅ 90 mm) :
20 boîtes BM16708

Milieu déshydraté
Flacon de 500 g BK214HA

Supplément sélectif RHAPSODY
10 flacons qsp 500 mL BS08908

10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

XP ISO/TS 11059 (V 04-025). Octobre 2009. Lait et produits laitiers. Méthode de dénombrement des *Pseudomonas* spp.

NF EN ISO 13720 (V08-504). Novembre 2010. Viandes et produits à base de viandes. Dénombrement des *Pseudomonas* spp. présomptifs.

11 AUTRES INFORMATIONS

RHAPSODY Agar® est une marque de SOLABIA S.A.S..

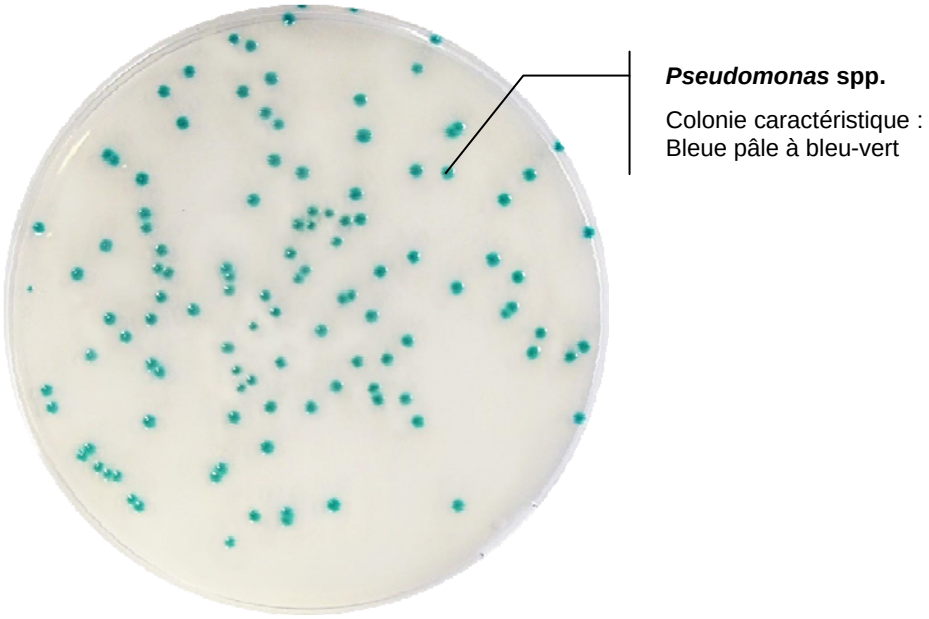
Code document : RHAPSODY/FR/5.
Date création : 01-2013
Date de révision : 09-2015
Motif de révision : Révision générale.

RHAPSODY Agar®

Détection et dénombrement des *Pseudomonas* spp.

Lecture :

Croissance obtenue après 48 heures d'incubation à 30 °C.



La taille des colonies et l'intensité de la coloration bleue à bleu-vert peuvent varier selon les espèces de *Pseudomonas* rencontrées.